



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 47/48</b>	<b>A2</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/03700</b>  (43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01141</p> <p>(22) Date de dépôt international: 19 juillet 1996 (19.07.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 95/08723 19 juillet 1995 (19.07.95) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR DE LYON [FR/FR]; Avenue Tony-Garnier, F-69007 Lyon (FR). PARTEUROP DEVELOPPEMENT [FR/FR]; 32, avenue Félix-Faure, F-69007 Lyon (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): LORTAT-JACOB, Hugues [FR/FR]; 9, rue Thévenet, F-69004 Lyon (FR).</p> <p>(74) Mandataire: TONNELIER, Jean-Claude; Nony &amp; Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>
<p>(54) Title: GAMMA-INTERFERON ACTIVITY MODULATING AGENT</p> <p>(54) Titre: AGENT MODULATEUR DE L'ACTIVITE DE L'INTERFERON-GAMMA</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The use of a modulating agent including a grouping of formula A-X-B for preparing a <math>\gamma</math>-interferon activity modulating drug is disclosed. In said formula, each of A and B is independently an oligosaccharide group with a sufficient anionic charge such that said oligosaccharide group has an affinity for a portion of the human <math>\gamma</math>-interferon C-terminal containing peptide sequence 125-131, and X is a spacer arm long enough to enable each of groups A and B to bind to one of said <math>\gamma</math>-interferon homodimer C-terminal peptide sequences. Said modulating agent is particularly useful for delaying the decomposition of <math>\gamma</math>-interferon, promoting the activation thereof and enabling it to have systemic and not just local activity. Said agent is also useful for modifying or inhibiting the local action of endogenous <math>\gamma</math>-interferon.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Utilisation, dans la préparation d'un médicament modulateur de l'activité de l'interféron-<math>\gamma</math>, d'un agent modulateur comprenant un groupement de formule A-X-B, dans laquelle A et B représentent indépendamment un groupe oligosaccharidique portant une charge anionique suffisante pour conférer audit groupe oligosaccharidique une affinité pour une partie de l'extrémité C-terminale de l'interféron-<math>\gamma</math> humain contenant la séquence peptidique 125-131, et X est un bras espaceur de longueur suffisante pour permettre aux groupes A et B de se lier chacun à l'une desdites séquences peptidiques des extrémités C-terminales d'un homodimère d'interféron-<math>\gamma</math>. Cet agent modulateur permet notamment de retarder la dégradation de l'interféron-<math>\gamma</math>, de favoriser son activation, de permettre son action par voie générale et non simplement locale. Il permet également de modifier ou d'inhiber l'action locale de l'interféron-<math>\gamma</math> endogène.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Agent modulateur de l'activité de l'interféron-gamma.

L'invention a pour objet un agent modulateur de l'activité de l'interféron- $\gamma$ .

5 L'interféron- $\gamma$  est une cytokine qui joue un rôle très important dans la réponse immunitaire. On sait que l'interféron- $\gamma$  intervient dans la régulation de l'induction des lymphocytes T cytotoxiques, augmente l'activité des cellules tueuses NK, favorise la fonction de présentation des antigènes par les macrophages, et qu'il est utilisé notamment comme médicament anti-tumeur et anti-viral.

10 La mise au point d'une thérapeutique basée sur l'utilisation de l'interféron- $\gamma$  pose toutefois des problèmes techniques difficiles en raison notamment de sa courte durée de demi-vie *in vivo* et de son action essentiellement locale, ce qui nécessite la mise au point de modes d'administration particuliers ; voir par exemple Yoshihiko Watanabe et al., P.N.A.S. USA, 86, 9456-9460 (1989) ; J. du Plessis et al., Antiviral Research, 18, 259-265 (1992) ; et C. Boutin et al., Cancer, 74, 2460-2467 (1994).

15 On sait que l'interféron- $\gamma$  se fixe sur la matrice extracellulaire du tissu conjonctif et plus particulièrement sur les protéoglycannes à héparane-sulfate. La partie C-terminale de l'interféron- $\gamma$  comprend une séquence peptidique 125-131, riche en motifs dérivés d'acides aminés basiques, qui intervient principalement dans l'affinité de liaison de l'interféron- $\gamma$  avec l'héparane-sulfate ; voir par exemple H. Lortat-Jacob et al., C.R. Acad. Sci., Paris, t.311, série III, 143-147 (1990) ; FEBS Lett., 280, 152-154 (1991) ; et J. Clin. Invest., 87, 878-883 (1991). Il a en outre été suggéré que la fixation sur l'héparane-sulfate stabilise et active l'interféron- $\gamma$ , et certaines hypothèses ont été faites pour tenter d'expliquer ces phénomènes ; voir H. Lortat-Jacob et J.-A. Grimaud, Cell. Mol. Biol., 37, 253-260 (1991).

25 Des tentatives d'identification des sites de l'héparane-sulfate responsables de l'affinité pour l'interféron- $\gamma$  ont été effectuées lors d'études préliminaires qui ont conduit à l'hypothèse que la liaison avec l'interféron- $\gamma$  se ferait par des groupes carboxylés et non par des groupes N-sulfatés qui sont présents dans un domaine de l'héparane-sulfate appelé "domaine de type héparine" ; voir H. Lortat-Jacob et J.-A. Grimaud, Biochimica et Biophysica Acta, 1117, 126-130 (1992).

30

On a maintenant découvert qu'en réalité l'affinité élevée de l'héparane-sulfate pour l'interféron- $\gamma$  résulte de la présence, dans l'héparane-sulfate, de deux domaines qui contiennent des groupements sulfatés et qui se fixent chacun sur la partie C-terminale d'une des chaînes de l'interféron- $\gamma$  présent sous la forme d'un homodimère. Les deux  
5 domaines de liaisons sont reliés, dans l'héparane-sulfate, par une chaîne saccharidique faiblement sulfatée de longueur telle que les groupements impliqués dans la liaison avec la partie C-terminale puissent se trouver respectivement en regard de leur site de liaison sur l'homodimère. Ainsi, l'organisation de ces domaines confère à l'héparane-sulfate une forte affinité pour l'interféron- $\gamma$ .

10 Cette découverte a permis de concevoir un agent ayant notamment une activité de potentialisateur de l'interféron- $\gamma$ , permettant notamment de faciliter le transport de l'interféron- $\gamma$  dans la circulation générale et dans les tissus, en évitant que l'interféron- $\gamma$  soit capturé par la matrice extracellulaire du tissu conjonctif. Grâce à l'agent  
potentialisateur de l'invention, on peut envisager pour la première fois une action de  
15 l'interféron par voie générale, et non une action simplement locale. En outre, l'agent potentialisateur de l'invention augmente la durée de demi-vie de l'interféron- $\gamma$  dans l'organisme tout en évitant ou retardant sa dégradation et en favorisant son activation, comme cela sera montré dans la partie expérimentale ci-après. Par ailleurs, l'action de transport de l'interféron- $\gamma$  par l'agent de l'invention s'applique aussi à l'interféron- $\gamma$   
20 endogène et peut donc modifier, réduire ou supprimer l'action locale de celui-ci. Par exemple, il est connu que l'interféron- $\gamma$  induit l'expression des antigènes de classe II et l'expression des molécules d'adhésion (ICAM) des lymphocytes T, par les cellules endothéliales, et peut donc participer notamment au rejet des greffes d'organes. L'agent de l'invention peut avoir un effet antagoniste de cette action de l'interféron- $\gamma$ , et possède  
25 alors une activité d'immunosuppresseur. Ainsi, l'agent de l'invention est capable de moduler l'activité de l'interféron- $\gamma$  endogène et/ou exogène. Un tel agent modulateur peut donc avoir, selon les cas, un effet potentialisateur ou un effet d'antagoniste.

On rappelle que le sigle ICAM désigne des molécules intercellulaires d'adhésion des cellules (Intercellular Cell Adhesion Molecule).

L'invention a donc pour objet l'utilisation comme agent modulateur de l'activité de l'interféron- $\gamma$  d'un composé comprenant un groupement répondant à la formule A-X-B, dans laquelle A et B représentent indépendamment un groupe oligosaccharidique portant une charge anionique suffisante pour conférer audit groupe oligosaccharidique une affinité pour une partie de l'extrémité C-terminale de l'interféron- $\gamma$  humain contenant la séquence peptidique 125-131, et X est un bras espaceur de longueur suffisante pour permettre aux groupes A et B de se lier par affinité chacun à l'une des extrémités C-terminales d'un homodimère d'interféron- $\gamma$ .

Dans la formule A-X-B, A et B sont reliés au bras espaceur par des liaisons covalentes.

On rappelle que la séquence peptidique 125-131 de l'extrémité C-terminale de l'interféron- $\gamma$  humain est la suivante (voir par exemple Rinderknecht *et al.*, J. Biol. Chem., 259, 6790-6797 (1984)) :

Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg.

L'invention concerne en particulier l'utilisation des composés A-X-B comme ingrédient actif dans la préparation d'un médicament destiné à moduler l'activité de l'interféron- $\gamma$ .

Afin de mieux faire comprendre les découvertes expérimentales qui sont à la base de l'invention, il convient de rappeler préalablement certaines données physico-chimiques concernant l'interféron- $\gamma$  et les polysaccharides du type héparane-sulfate et héparine.

On sait que l'héparine et l'héparane-sulfate font partie de la famille des glycosaminoglycanes, qui sont des produits ayant des motifs répétitifs disaccharidiques osamine/acide uronique.

La structure de l'héparane-sulfate de fibroblaste humain a été étudiée notamment par J. E. Turnbull et J. T. Gallagher, Biochem. J., 273, 553-559 (1991). Ces auteurs ont montré que la dépolymérisation de l'héparane-sulfate par l'héparinase clive de façon spécifique des disaccharides fortement sulfatés ayant la structure glucosamine (N-sulfatée et éventuellement 6-sulfatée)- $\alpha$  1,4-acide iduronique (2-sulfaté), et que l'héparane-sulfate contient environ 10 % de liaisons susceptibles d'être clivées par cette enzyme. Les produits de dépolymérisation par l'héparinase sont des oligosaccharides ayant une masse moléculaire moyenne de 10 kDa environ. Ces oligosaccharides résistent à l'héparinase

sont très sensibles à la dépolymérisation par l'héparitinase qui clive l'héparane-sulfate dans des zones de faible sulfatation, où les disaccharides prédominants sont du type N-acétyl (ou occasionnellement N-sulfate) glucosamine- $\alpha$  1,4-acide glucuronique. Les mêmes auteurs ont également montré que les sites de clivage de l'héparinase sont regroupés dans des domaines ayant des longueurs moyennes de 4 à 7 disaccharides. L'héparane-sulfate a donc une structure polymère composée d'arrangements successifs de domaines hautement sulfatés et faiblement sulfatés.

Dans l'héparine (voir par exemple J.T. Gallagher et A. Walker, *Biochem. J.* **230**, 665-674, 1985), l'osamine est aussi la glucosamine N-acétylée ou N-sulfatée et l'acide uronique est principalement l'acide L-iduronique éventuellement 2-sulfaté. Sa structure est donc semblable à celle de l'héparane-sulfate, et ne diffère de celui-ci que par le degré de sulfatation et par le degré d'épimérisation de l'acide glucuronique en acide iduronique. L'héparine est donc peu sensible à l'action de l'héparitinase (qui coupe les glycosaminoglycanes au niveau d'un acide glucuronique) mais est fortement dépolymérisée par l'héparinase (qui coupe au niveau d'un acide iduronique 2-sulfaté).

On va maintenant décrire plus en détail certains modes de réalisation de l'invention.

L'agent modulateur de l'invention contient des groupes terminaux A et B, qui peuvent être semblables ou non, et qui peuvent être constitués de tout oligosaccharide portant une charge anionique suffisante pour permettre la liaison avec la partie C-terminale de l'interféron- $\gamma$ , par affinité de type anion-cation.

Les groupes oligosaccharidiques peuvent contenir notamment des groupements sulfate et/ou phosphate, avec un taux de sulfatation et/ou de phosphatation suffisant pour conférer l'affinité pour la partie C-terminale de l'interféron- $\gamma$ .

En particulier, les groupes oligosaccharidiques A et B contiennent des motifs dérivés d'une osamine N-sulfatée, ou des motifs dérivés d'acides uroniques sulfatés, ou encore tous autres motifs portant des groupements anioniques en quantité suffisante pour conférer auxdits groupes A et B une affinité pour l'interféron- $\gamma$ , et en particulier pour une partie de l'extrémité C-terminale de l'interféron- $\gamma$ .

Parmi les groupes oligosaccharidiques constituant les extrémités A et B, on citera notamment les groupes oligosaccharidiques qui contiennent en alternance, des motifs

disaccharidiques dérivés d'une osamine et d'un acide uronique, comme dans les glycosaminoglycanes.

Ces groupes oligosaccharidiques A et B peuvent être notamment des fragments de dépolymérisation pouvant être obtenus par l'action de l'héparitinase sur l'héparane-sulfate. Il peut s'agir aussi d'autres produits de dépolymérisation qui peuvent éventuellement être soumis à une réaction de substitution par des substituants portant un groupe anionique (par exemple sulfate ou phosphate), selon les méthodes connues, lorsque le produit de départ n'a pas une charge anionique suffisante.

Les groupes oligosaccharidiques A et B peuvent contenir par exemple de 6 à 14, en particulier de 6 à 10 motifs saccharidiques.

Le bras espaceur représenté par X, dans la formule mentionnée ci-dessus de l'agent potentialisateur de l'invention, peut être tout polymère (par exemple polyoside ou polyglycol) ayant une longueur suffisante pour permettre aux groupes terminaux A et B de se fixer chacun sur l'une des extrémités C-terminales d'un homodimère d'interféron- $\gamma$ .

L'expression polyglycol désigne conventionnellement un bras poly(alkylèneoxy).

Le bras espaceur peut aussi être dérivé d'un polyester tel qu'un poly(acide lactique) ou poly(acide glycolique), dont les extrémités sont liées aux groupements A et B par des liaisons ester ou amide par exemple.

On montre ci-après dans la partie expérimentale comment cette longueur suffisante peut être déterminée par de simples expériences de routine. Bien entendu, l'agent modulateur peut être présent sous la forme d'un composé Y-A-X-B-Z dans lequel Y et Z, semblables ou différents, sont des groupements polymères ou oligomères analogues notamment aux groupements X, A ou B (voir l'exemple II de la partie expérimentale ci-après).

Plus généralement, chacune des expériences décrites dans l'Exemple II peut servir à sélectionner les agents modulateurs les plus appropriés.

Par exemple, dans le cas où le bras espaceur est un polysaccharide, il peut contenir de 24 à 32 motifs saccharidiques environ.

Lorsque le bras espaceur est un polyglycol, il peut s'agir par exemple d'un bras dérivé d'un polyéthylèneglycol, c'est-à-dire un bras  $\text{---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{---}$ , n étant le nombre de motifs éthoxy.

Dans des modes de réalisation particuliers, le bras espaceur est un polymère dont au moins certains motifs peuvent contenir des groupements anioniques tels que des groupements sulfate, phosphate ou acide carboxylique. On peut utiliser notamment comme bras espaceurs des fragments de dépolymérisation de polysides naturels tels que le polydextran, la cellulose, l'amidon, le carraghénane, le fucoïdan (Sigma), des glycosaminoglycanes et leurs dérivés, notamment leurs dérivés porteurs de groupements anioniques.

Ces fragments de dépolymérisation peuvent être obtenus selon les méthodes connues, notamment par hydrolyse acide ou basique, par l'action des ultrasons, par digestion enzymatique ou par réaction de dépolymérisation par oxydo-réduction (dite ORD) ("oxidative reductive depolymerization") ; voir par exemple Manssur Yalpani, "Polysaccharides-Syntheses, Modifications and Structure/Property Relations", Elsevier (1988).

Les fragments de dépolymérisation de longueur convenable susceptibles de constituer le bras espaceur X sont séparés selon les méthodes usuelles. Lorsqu'ils ne contiennent pas de groupes anioniques, ils peuvent éventuellement être modifiés pour introduire de tels groupes anioniques selon les méthodes connues. On peut également utiliser les produits de dépolymérisation de certains polymères contenant déjà des groupes anioniques, par exemple la carboxyméthyl- ou carboxyéthyl-cellulose, le carboxyméthyl- ou carboxyéthyl-amidon, le dextran sulfate, etc.

Selon un mode de réalisation particulier, le bras espaceur est un fragment de dépolymérisation pouvant être obtenu par l'action de l'héparinase sur l'héparane-sulfate. On utilise par exemple des fragments de dépolymérisation ayant des masses moléculaires de 6 à 7 kDa.

Selon un autre mode de réalisation particulier, le bras espaceur peut être une héparine N-acylée obtenue par N-désulfatation suivie de N-acylation ; pour les procédés de N-désulfatation et de N-acylation, voir notamment *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Ac. Press., Vol.VIII, pp.291-294 et le document PCT WO 92/22588.

L'agent modulateur de l'interféron- $\gamma$  peut être préparé en faisant réagir des dérivés réactifs précurseurs des groupes A et/ou B, simultanément ou séquentiellement, avec un dérivé réactif précurseur du bras espaceur X, selon les méthodes classiques permettant



l'établissement de liaisons covalentes entre A et X et entre B et X. Il est à la portée des spécialistes de choisir les dérivés, comprenant les groupes réactifs, de A, B ou X et/ou les groupements protecteurs permettant de diriger la réaction en protégeant temporairement l'un des groupes réactifs.

- 5 Les groupes réactifs peuvent être déjà naturellement présents dans le produit de départ ou être introduits selon les méthodes connues.

Par exemple, lorsque le bras espaceur est un composé polysaccharidique, on peut préparer le composé A-X-B selon les méthodes connues de synthèse utilisées dans la chimie des sucres ; voir notamment "Carbohydrate Chemistry, John F. Kennedy Ed.,  
10 Clarendon Press - Oxford (1988), 500-593 ; et Manssur Yalpani, "Polysaccharides-Syntheses, Modifications and Structure/Property Relations", Elsevier (1988), pp.144-181. Pour obtenir un bras espaceur polyglycol, on peut par exemple utiliser une méthode analogue à celle décrite par P. Westerduin et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35(3), 331-333 (1996).

- 15 On peut, dans certains cas, préparer l'agent potentialisateur de l'invention par dépolymérisation partielle d'un glycosaminoglycane (tel qu'un héparane-sulfate) convenablement protégé : voir par exemple la préparation du fragment IPD dans la partie expérimentale ci-après.

L'agent potentialisateur peut également être constitué par de l'héparine ou des  
20 fragments de dépolymérisation d'héparine de taille convenable, et dans ce cas particulier il n'y a pas lieu de distinguer entre les parties A, X et B (ou A, X, B, Y et Z) : on obtient directement, par dépolymérisation et sélection des fragments de taille convenable, l'agent potentialisateur. Certaines parties de la molécule d'héparine ou desdits fragments interviennent dans la liaison avec l'interféron- $\gamma$  et jouent donc le rôle des parties A et B,  
25 tandis que la zone médiane desdits fragments, qui a sensiblement la même structure que les parties d'extrémité, joue le rôle de bras espaceur. Dans le cas où l'agent modulateur de l'invention est à base d'héparine, il est généralement souhaitable de modifier celle-ci chimiquement pour supprimer ou diminuer son activité anti-coagulante.

La dépolymérisation (facultative) de l'héparine (dans le cas où l'héparine de  
30 départ a une masse moléculaire élevée) peut être mise en oeuvre selon les méthodes connues permettant d'obtenir des fragments de taille suffisante. L'isolement des

fragments de dépolymérisation de taille appropriée est effectué de façon connue en soi, par exemple par tamisage moléculaire.

L'agent modulateur de l'invention peut être en outre tout polymère biocompatible (y compris des copolymères séquencés), contenant des groupements anioniques (sulfate, phosphate) en quantité suffisante au moins sur deux sites correspondant à A et B de la formule donnée ci-dessus. On peut utiliser en particulier des polysaccharides que l'on peut sulfater selon les méthodes décrites dans la littérature (voir par exemple Methods in Carbohydrate Chemistry Ac. Press, Vol.III, pp.265-267, et Vol.VI, pp.426-429).

On peut également utiliser des polysaccharides sulfatés commerciaux (voir l'exemple II de la partie expérimentale ci-après).

Les groupes anioniques présents dans l'agent modulateur de l'invention, ou une partie desdits groupes, peuvent être salifiés. On peut utiliser notamment les sels alcalins et alcalino-terreux, par exemple les sels de sodium.

L'agent de l'invention peut être utilisé comme médicament. Lorsqu'il est utilisé seul, il constitue un médicament destiné à moduler l'activité de l'interféron- $\gamma$  endogène. Un tel médicament est administré à des doses qui peuvent être déterminées préalablement par des expériences de routine, en fonction notamment de l'effet recherché. Ces doses peuvent aller par exemple de 0,1 à 100 mg par individu et par jour, notamment de 1 à 10 mg.

L'agent modulateur de l'invention permet aussi de réaliser un médicament à base d'interféron- $\gamma$ , capable d'agir par voie générale. Un tel médicament contient donc en combinaison l'agent modulateur et l'interféron- $\gamma$ , de préférence à raison d'au moins une mole environ d'agent modulateur pour deux moles d'interféron- $\gamma$ .

Dans ce médicament, l'agent modulateur empêche la capture de l'interféron- $\gamma$  par les molécules d'héparane-sulfate endogène, présentes par exemple dans la matrice extracellulaire, et permet donc son maintien et son transport dans la circulation générale. En outre, l'agent modulateur protège l'interféron- $\gamma$  contre les dégradations susceptibles de réduire ou d'annuler son activité, et il permet de maintenir l'interféron- $\gamma$  sous sa forme la plus active jusqu'au moment de son action sur les cellules compétentes.

Le médicament de l'invention est préparé selon les méthodes usuelles et contient les véhicules et adjuvants permettant de le présenter sous une forme apte à être

administrée notamment par voie intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée, ou encore par voie locale (par exemple cutanée, intra-nasale ou intra-bronchique).

L'agent modulateur et l'interféron- $\gamma$ , lorsqu'ils sont utilisés en combinaison, peuvent être mélangés préalablement dans le médicament, ou être présents dans des  
5 conteneurs séparés à mélanger au moment de l'emploi.

Le médicament de l'invention, lorsqu'il est utilisé en combinaison avec l'interféron- $\gamma$  exogène, est administré de façon à fournir des doses suffisantes d'interféron- $\gamma$ . Ces doses dépendent notamment du mode d'administration, du poids corporel et de la nature et de la gravité de la maladie à traiter. Par exemple, par voie  
10 sous-cutanée ou intramusculaire, on peut administrer de  $10^5$  à  $10^7$  unités d'interféron- $\gamma$  par injection, et effectuer de 3 à 7 injections par semaine.

Le médicament de l'invention peut être utilisé dans tous les cas où l'une des activités de l'interféron- $\gamma$  a un intérêt thérapeutique. Parmi ces activités, on pourra citer les effets immunostimulants, par exemple l'effet anti-prolifératif dans les cancers et  
15 l'activation des défenses immunitaires dans les maladies infectieuses (virales, bactériennes ou parasitaires), ou encore la capacité de bloquer la synthèse de collagène dans les fibroses d'organes ... etc.

L'invention a donc également pour objet un procédé amélioré de traitement à l'interféron- $\gamma$ , dans lequel on administre, outre l'interféron- $\gamma$ , un agent modulateur tel que  
20 défini ci-dessus. L'agent modulateur peut être administré en même temps que l'interféron- $\gamma$  ou (par exemple en administration intraveineuse) peu de temps (notamment moins de 2 minutes) avant ou après l'interféron- $\gamma$ .

L'interféron- $\gamma$  est présenté généralement sous la forme d'un lyophilisat que l'on dissout dans un véhicule liquide stérile au moment de l'emploi. L'agent potentialisateur de  
25 l'invention peut être présenté sous forme de lyophilisat, ou sous forme de solution aqueuse (en particulier de solution dans le sérum physiologique), et dans ce dernier cas, on peut dissoudre l'interféron- $\gamma$  lyophilisé dans la solution d'agent modulateur.

L'invention concerne en outre un procédé de modulation de l'activité de l'interféron- $\gamma$ , destiné notamment à permettre une action de l'interféron- $\gamma$  par voie  
30 générale et non seulement locale, et/ou destiné à augmenter la durée de demi-vie de

l'interféron- $\gamma$  dans l'organisme, à éviter sa dégradation dans l'organisme et à favoriser son activation et/ou à moduler l'activité, notamment l'activité locale, de l'interféron- $\gamma$  endogène, ce procédé étant caractérisé par le fait que l'on administre, à un sujet ayant besoin d'un tel médicament, un médicament comprenant comme ingrédient actif un agent modulateur tel que défini ci-dessus. Lorsque le médicament est utilisé en association avec de l'interféron- $\gamma$  exogène, on administre en même temps que l'interféron- $\gamma$ , ou peu de temps avant ou après, l'agent potentialisateur tel que défini précédemment.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

#### 10 EXEMPLE I : Agent modulateur dérivé d'héparane-sulfate

##### 1 : Obtention d'héparane-sulfate marqué au tritium

On cultive des fibroblastes de peau humaine jusqu'à confluence, puis les cultures sont mises en incubation pendant 72 heures dans un milieu DMEM/10% FCS contenant 10  $\mu\text{Ci/mL}$  (soit 0,37 MBq/mL) de glucosamine tritiée (Amersham). Après 72 heures d'incubation, on sépare les cellules du milieu de culture et les soumet à l'action de la trypsine pendant 15 minutes, puis on centrifuge et recueille le surnageant qui, additionné de milieu de culture, est chargé sur une colonne DEAE Sephacel (Pharmacia) équilibrée avec un tampon 20mM phosphate de sodium 0,15 M NaCl, pH 6,8. On applique un gradient linéaire de chlorure de sodium 0,15-0,8 M à raison de 0,2 mL/min. On recueille le pic correspondant aux protéoglycanes héparane-sulfate, qui est élué avec des tampons 0,5-0,6 M NaCl environ. Après dialyse contre de l'eau distillée pour éliminer les sels, on évapore le solvant sous vide et soumet le résidu à une digestion avec la chondroïtinase ABC (Sigma) et la papaïne (Sigma) de façon à éliminer les chondroïtines sulfates contaminant éventuellement la préparation, et à dégrader la partie protéique des protéoglycannes à héparanes sulfates.

On soumet le produit obtenu à une chromatographie sur colonne DEAE Sephacel et on recueille l'héparane-sulfate purifié qui est élué avec un tampon phosphate de sodium 20 mM, NaCl 1M.

DMEM signifie : milieu de Eagle modifié par Dulbecco.

FCS signifie : sérum de veau foetal

## 2 : Préparation d'une colonne de chromatographie d'affinité (ligand : interféron- $\gamma$ )

On mélange 1 mL de gel de chromatographie Affi-Gel 10 (BioRad) avec 1 mL de  
5 tampon 5 mMTris/HCl de pH6,8, contenant 0,5 mg d'interféron- $\gamma$  humain (ROUSSEL-  
UCLAF) et 1 mg d'héparine (Sigma). On sait que le gel Affi-Gel comporte des  
groupements réactifs permettant de fixer les groupes amines des protéines. La présence  
d'un excès d'héparine dans le tampon de couplage a pour but de protéger la région C-  
terminale de l'interféron- $\gamma$ , qui sinon serait susceptible de réagir avec la matrice d'Affi-  
10 Gel. Après 16 heures de contact à 4°C avec agitation, on dispose le produit obtenu dans  
une colonne et on le lave avec un tampon 50 mMTris/HCl de pH 6,8, puis avec le même  
tampon contenant en outre 2 M NaCl. Avant l'utilisation, la colonne de chromatographie  
d'affinité obtenue est lavée avec une solution 2 M NaCl puis équilibrée avec un tampon  
10 mMTris/HCl de pH 6,8 (tampon d'équilibration). Pour la chromatographie d'affinité,  
15 on utilise des échantillons de 200  $\mu$ L dans le tampon d'équilibration et on élue avec un  
gradient de chlorure de sodium de 0 à 1 M.

Sur la colonne de chromatographie d'affinité ainsi obtenue, l'héparine se fixe et est  
éluee par des solutions de chlorure de sodium de concentration supérieure à 0,5 M  
environ. Des résultats analogues ont été obtenus de façon constante lors de la répétition  
20 de l'expérience 20 fois consécutives.

## 3 : Fractionnement de l'héparane-sulfate et de ses produits de dépolymérisation sur la matrice d'affinité d'interféron- $\gamma$

25 L'héparane-sulfate marqué au tritium obtenu précédemment a été appliqué sur la  
colonne d'affinité d'interféron- $\gamma$  puis on élue successivement avec des solutions de  
chlorure de sodium de concentrations croissantes : 0,1-0,2-0,3-.....-1 M. On constate  
que l'héparane-sulfate se fixe sur l'interféron de la colonne d'affinité et peut être élué de  
façon fractionnée avec des solutions dans la gamme 0,3-0,6 M NaCl.

La dépolymérisation de l'héparane-sulfate (HS) avec l'acide nitreux et avec l'héparinase (Sigma) fournit des résidus qui ont pratiquement perdu toute affinité pour l'interféron- $\gamma$ .

5 La dépolymérisation de HS par l'héparitinase (Sigma ; 10 U/mL) donne 60 à 70 % de produits qui ne se fixent pas sur l'interféron, le reste des produits obtenus se fixant sur l'interféron et étant élué avec des solutions dans la gamme 0,1-0,3 M NaCl. L'affinité pour l'interféron de ces derniers produits est donc diminuée, par rapport à HS intact.

10 Les produits de la digestion par l'héparitinase qui se fixent sur l'interféron sont des oligosaccharides N-sulfatés, ayant des degrés de polymérisation de 2 à 12 et pouvant être séparés par tamisage moléculaire sur une colonne de Bio-Gel P-6 (BioRad). Les fractions obtenues sont passées individuellement sur la colonne d'affinité d'interféron- $\gamma$ . L'affinité augmente avec le degré de polymérisation des oligosaccharides, mais elle est relativement faible, puisque les oligosaccharides les plus longs (degré de polymérisation : 12) sont déjà élués avec des concentrations en chlorure de sodium allant de 0,2 à 0,3 M.

15

#### 4 : Digestion d'héparane-sulfate protégé par l'interféron- $\gamma$

Dans une solution tampon 50mM Tris/HCl pH 7,6 contenant 10  $\mu$ M d'interféron- $\gamma$  (concentration calculée sur la molécule monomère) et 5  $\mu$ M environ d'héparane-sulfate, 20 on ajoute de l'héparitinase jusqu'à une concentration finale de 25 U/mL.

On effectue en outre une digestion de HS dans les mêmes conditions mais en l'absence d'interféron- $\gamma$ , pour comparaison.

25 Les produits de digestion (4 heures à 30°C) ont été analysés par chromatographie sur Bio-Gel P-10. On élue avec une solution 0,5 M d'hydrogénocarbonate d'ammonium, à raison de 4 mL par heure. On constate que la digestion de HS par l'héparitinase a fourni des oligosaccharides ayant un degré de polymérisation (dp) de 2 à 14.

30 Lorsque la digestion est effectuée en présence d'interféron- $\gamma$ , on observe à l'élution des pics supplémentaires. Les pics obtenus sont recueillis, lyophilisés et remis en suspension dans le tampon d'équilibration utilisé pour la chromatographie d'affinité. On constate que le premier pic supplémentaire (pic I) a une affinité pratiquement identique à celle de HS intact. Les produits du pic I sont élués, dans la colonne de chromatographie

d'affinité, avec des solutions de concentrations 0,4 et 0,5 M NaCl environ (produits majoritaires) et des produits minoritaires sont élués avec des concentrations de 0,3 et 0,6 M NaCl environ.

Des expériences semblables, répétées avec des héparanes-sulfates issus de fibroblastes provenant de deux donneurs différents, ont donné des résultats identiques.

Les produits du pic I correspondent donc à un domaine de HS protégé par l'interféron- $\gamma$  notamment contre la dépolymérisation par l'héparitinase. Ces produits sont appelés ci-après "IPD".

L'IPD est donc un fragment d'héparane-sulfate ayant une forte affinité avec l'interféron- $\gamma$  auquel il est capable de se lier. L'IPD est davantage caractérisé ci-après.

#### 5 : Caractérisation de l'IPD

On a soumis l'IPD à des réactions de dépolymérisation dans les conditions suivantes :

a) dépolymérisation par l'acide nitreux, à pH 1,5 pendant 15 minutes à température ambiante ;

b) dépolymérisation par l'héparinase (10 U/mL) pendant 15 heures à 30°C.

Dans chaque cas, on a comparé la dépolymérisation de l'IPD avec la dépolymérisation du HS dont il est issu.

Les produits de dépolymérisation ont été comparés par tamisage moléculaire sur Bio-Gel P-6.

On constate que l'on obtient, avec l'IPD, 35 % de disaccharides contre 18 % seulement pour HS, indiquant un nombre plus élevé de disaccharides contigus dont la glucosamine est N-sulfatée, dans l'IPD que dans HS. Par ailleurs, la taille des oligosaccharides résistant à  $\text{HNO}_2$  est plus petite dans l'IPD que dans HS, indiquant l'absence de longues séquences dépourvues de glucosamines N-sulfatées dans l'IPD. L'analyse des profils de digestion de l'IPD et HS permet de calculer (par la formule  $F = \text{somme des } H_i/n_i$  où  $H_i$  est le pourcentage de radioactivité dans le pic n° i, et  $n_i$  est le nombre de disaccharides de ce pic) que 61 % des disaccharides de l'IPD sont N-sulfatés, contre 42 % seulement pour HS. De plus, la répartition de ces disaccharides est

différente dans l'IPD et dans HS, comme mentionné ci-dessus. Enfin, la sensibilité supérieure de l'IPD à l'action de l'héparinase (par rapport à HS) démontre que l'IPD est enrichi en disaccharides contenant un acide iduronique sulfaté en position 2.

Par ailleurs, l'IPD contient un domaine résistant à l'héparinase. La masse moléculaire de ce domaine a été déterminée et comparée à celle de l'IPD par tamisage moléculaire sur Sepharose CL-6B (Pharmacia). Les masses moléculaires approximatives des échantillons ont été déterminées selon la méthode de Wasteson, J. Chromatogr. 59, 87-97 (1971). On a trouvé que l'IPD d'une part, et son domaine résistant à l'héparinase d'autre part, ont des masses moléculaires de 10 et 7 kDa, respectivement.

L'IPD et son domaine résistant à l'héparinase (HR-IPD) ont été soumis à une dépolymérisation par l'héparitinase dans les conditions suivantes : tampon 50mM TrisHCl pH 7,6 pendant 15 heures à 35°C, en présence de 10 U/mL d'héparitinase.

On rappelle qu'une unité (U) d'héparitinase est la quantité d'héparitinase permettant de produire, par action sur l'héparane-sulfate, 0,1 micromole d'acide uronique insaturé par heure.

Les produits de dépolymérisation ont été analysés sur colonne Bio-Gel P-6.

Le domaine HR-IPD est très sensible à la dépolymérisation par l'héparitinase qui fournit 67 % de disaccharides et 26 % de tétrasaccharides. L'analyse du profil de digestion montre que 82 % des liaisons entre disaccharides ont été clivées. Cela montre que cette région est riche en disaccharides contenant un motif glucuronique, la majorité de ces disaccharides étant N-acétylés.

L'analyse de la composition des disaccharides obtenus par dépolymérisation de l'HR-IPD avec l'héparitinase a été effectuée par HPLC sur colonne échangeuse d'anions. Cette analyse montre une teneur élevée en disaccharides N-acétylés non sulfatés (58 %) et 31 % de disaccharides N-sulfatés sans groupes O-sulfate. En outre, le traitement de l'IPD intact avec l'héparitinase donne deux produits principaux résistant à l'héparitinase, correspondant à des hexasaccharides et à des octasaccharides qui ne sont pas présents dans le domaine HR-IPD. Ces fragments représentent donc les séquences hautement N-sulfatées qui sont clivées et partiellement dégradées par le traitement à l'héparinase. Ces fragments sont complètement dégradés en disaccharides par l'acide nitreux, ce qui montre qu'ils sont composés de séquences contiguës de disaccharides N-sulfatés. Ces



fragments sont également clivés par l'héparinase, les octasaccharides donnant principalement des produits tétrasaccharidiques et les hexasaccharides donnant un mélange de tétrasaccharides et de disaccharides, ce qui indique la présence de motifs glucosamine N-sulfatés (éventuellement 6-sulfatés)-acide iduronique 2-sulfaté.

5 L'affinité de ces hexasaccharides et octasaccharides pour l'interféron a également été testée à l'aide de la colonne de chromatographie d'affinité. On a observé que ces oligosaccharides n'ont qu'une faible affinité pour l'interféron- $\gamma$ , similaire à celle observée pour les fragments de même taille obtenus par l'action de l'héparitinase sur le HS intact (voir 3 ci-dessus).

10 De même, le domaine HR-IPD n'a qu'une faible affinité pour l'interféron- $\gamma$  et est élué avec des concentrations en chlorure de sodium comprises entre 0,1 et 0,2 M.

Ainsi, l'IPD comprend des régions de structures distinctes qui, quoique n'ayant individuellement qu'une faible affinité pour l'interféron- $\gamma$ , agissent de façon synergique, en ce qui concerne l'affinité pour l'interféron- $\gamma$ , lorsqu'elles sont combinées.

15

#### 6 : Réticulation de l'interféron- $\gamma$ par l'héparane-sulfate

On mélange 250 ng d'interféron- $\gamma$  avec différentes concentrations de HS en solution aqueuse et on laisse incubé pendant 30 minutes à 4°C avec 2mM EDC (1-éthyl-  
20 3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimine), agent de couplage hétéro-bifonctionnel commercialisé par Pierce) en présence de N-hydroxysulfosuccinimide (S-NHS), qui active les groupes carboxyliques, à une concentration de 1 mM, pour augmenter le rendement de couplage de l'EDC. Au bout de 15 minutes, on arrête les réactions à l'aide  
25 d'un tampon dit d'échantillon d'électrophorèse, et on analyse les produits de réticulation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). On rappelle qu'un tampon dit d'échantillon d'électrophorèse contient environ 2% de dodécylsulfate de sodium qui dénature les protéines (Laemmli, Nature, 227, 680-685 (1970)).

Par ailleurs, on a fait réagir de l'interféron- $\gamma$  avec un subérate de  
30 bis(sulfosuccinimidyle) (en abrégé BS<sup>3</sup>), un réactif de couplage homo-bifonctionnel commercialisé par Pierce.

On a trouvé que l'interféron- $\gamma$  migre comme un monomère de 17 kDa par électrophorèse en milieu dénaturant (gel de 15 % polyacrylamide, 0,1 % SDS, 4M urée).

Lorsque l'interféron- $\gamma$  a réagi avec BS<sup>3</sup> avant l'électrophorèse, on observe une bande de 34 kDa, ce qui montre que la molécule était sous la forme d'un dimère.

5 En revanche, le réactif EDC/S-NHS ne réticule pas les deux monomères d'interféron- $\gamma$ , probablement pour la raison qu'il n'y a pas de groupe amino en position favorable à proximité d'un groupe carboxylique entre les deux monomères.

Lorsque l'interféron- $\gamma$  est mis en réaction avec le système EDC/S-NHS en présence de diverses concentrations de HS provenant de la muqueuse intestinale bovine  
10 (Sigma) de façon à réticuler les groupes carboxyliques d'acide uronique de HS avec les groupes aminés de l'interféron- $\gamma$ , le matériau obtenu a une masse moléculaire de 50 kDa environ avec deux bandes mineures à 17 et 34 kDa. Ce poids moléculaire de 50 kDa est compatible avec celui attendu pour un dimère d'interféron- $\gamma$  (34 kDa) réticulé avec une molécule de HS (16 kDa). Même lorsqu'on utilise un large excès de HS (10 moles pour 2  
15 moles d'interféron- $\gamma$  monomère), on obtient toujours le produit ayant un poids moléculaire de 50 kDa, ce qui montre qu'il s'agit d'une molécule de HS liée à 2 monomères d'interféron- $\gamma$  (34 kDa).

Il résulte des expériences précédentes que le domaine IPD de HS est constitué par un domaine interne de 7 kDa dont chaque extrémité est reliée avec un  
20 oligosaccharide terminal hexa- et/ou octa-saccharidique N-sulfaté, le domaine interne contenant de façon prédominante des disaccharides N-acétylés riches en acide glucuronique. Compte tenu de sa masse moléculaire, le domaine interne contient environ 15-16 motifs disaccharidiques.

25 **EXEMPLE II : Agent modulateur dérivé d'héparine, de dextran sulfate ou de fucoïdan**

Toute molécule (dérivée d'héparine ou d'autres polymères anioniques) capable de se lier par affinité avec les deux extrémités C-terminales de l'interféron- $\gamma$  dimère de façon  
30 à masquer les sites d'interactions avec l'héparane sulfate est susceptible d'utilisation comme agent modulateur de l'interféron- $\gamma$ . La recherche de telles molécules peut être

faite par une étude de compétition. Par exemple, on peut évaluer la capacité d'une molécule à entrer en compétition, pour la fixation à l'interféron- $\gamma$ , avec l'héparane-sulfate intact (ou l'IPD) radiomarké. Ces molécules peuvent être de l'héparine (éventuellement partiellement désulfatée afin de diminuer son activité anticoagulante), du dextran sulfate  
5 (polymère de glucose contenant jusqu'à 3 groupes sulfates par résidu glucose, et ayant une activité anticoagulante réduite -17 unités internationales d'héparine par mg ; Ricketts, W. Biochem. J., 51, 129 (1952)), du fucoïdan (polysaccharide composé de fucoses sulfatés : voir Black, W.A.P. *et al.*, J. Sci. Food Agri., 3, 122 (1952) et Grauffel, V. *et al.*, Biomaterials, 10, 363, (1989)), etc.

10 Une telle étude est illustrée ici avec des molécules d'héparine de différents poids moléculaires (1,8 - 4,5 - 9 - 12,5 - 21 kDa). De l'interféron- $\gamma$  (0,3  $\mu$ M) est mis en incubation dans 100  $\mu$ L de tampon 10 mM Tris/HCl pH 6,8, pendant une heure à température ambiante, avec 10000 cpm d'héparane-sulfate et avec des molécules d'héparine dont on peut ajuster les concentrations. Les mélanges réactionnels sont  
15 ensuite aspirés à travers un filtre de nitrocellulose (porosité 0,45  $\mu$ m) à l'aide d'un système de "dot-blot" relié à une trompe à vide. Les filtres de nitrocellulose sont ensuite rincés deux fois avec 200  $\mu$ L de tampon 10 mM Tris/HCl pH 6,8, puis dissous individuellement avec 500  $\mu$ L de DMSO et soumis à un comptage en scintillation liquide. Dans cette expérience, l'interféron- $\gamma$  s'adsorbe sur la nitrocellulose et retient avec lui les  
20 molécules qui lui sont associées. Les molécules (héparane-sulfate ou héparine) restées libres traversent le filtre de nitrocellulose sans être retenues. Ce test est basé sur la forte affinité de la nitrocellulose pour les protéines, et son absence d'interaction avec les polysaccharides. En l'absence de compétiteur, le filtre de nitrocellulose retient environ 3000 cpm d'héparane-sulfate. En présence d'héparine, la quantité d'héparane-sulfate liée à  
25 l'interféron- $\gamma$  diminue, démontrant que l'héparine est rentrée en compétition avec l'héparane-sulfate pour se lier à l'interféron- $\gamma$ . Cette expérience a montré aussi que les molécules ou fragments d'héparine doivent avoir un poids moléculaire au moins égal à 9 kDa pour interagir efficacement avec l'interféron- $\gamma$ .

Dans les expériences suivantes, on étudie l'effet de modulateur de l'interféron- $\gamma$ .

a) L'agent potentialisateur augmente le temps de demi-vie de l'interféron- $\gamma$  dans la circulation

De l'interféron- $\gamma$  humain, radiomarké à l'iode 125 a été injecté à des rats, par  
5 voie intraveineuse, à raison de 40  $\mu\text{g/kg}$  de poids corporel, seul ou en association avec  
de l'héparine (2000 U/kg de poids corporel) comme agent potentialisateur. Le taux  
circulant d'interféron- $\gamma$  a été suivi au cours du temps par mesure de la radioactivité  
précipitable par 10% de TCA, dans les fractions plasmatiques.

Injecté seul, l'interféron- $\gamma$  est éliminé du flux sanguin, de façon biexponentielle.  
10 Environ 90 % de la cytokine disparaît pendant les 5 à 10 premières minutes avec un  
temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 1,1 minute. Les 10 % restant (2ème partie de la courbe  
exponentielle) sont éliminés beaucoup plus lentement, avec un  $t_{1/2}$  de 94 minutes. En  
revanche, lorsque l'interféron- $\gamma$  est co-injecté avec de l'héparine comme agent  
potentialisateur, sa concentration plasmatique décrit une courbe monoexponentielle  
15 caractérisée par un temps de demi-vie de 99 minutes.

Il convient de noter que le récepteur de l'interféron- $\gamma$  ne participe pas aux effets  
observés, car l'interféron- $\gamma$  humain utilisé ici n'est pas reconnu par le récepteur de  
l'interféron- $\gamma$  des espèces murines. De plus, une injection d'héparine quelques minutes  
après l'injection d'interféron- $\gamma$  seul remet en circulation la cytokine, par effet de  
20 compétition avec des molécules endogènes de type héparine.

b) L'agent potentialisateur augmente in vivo l'activité biologique de l'interféron- $\gamma$

De l'interféron- $\gamma$  humain ( $4 \cdot 10^5 \text{U}$ ) a été injecté par voie intraveineuse à des rats de  
25 500 grammes environ, en association ou non à de l'héparine (2000 U/kg de poids  
corporel), comme agent potentialisateur. Aux temps 2, 10, 60 et 120 minutes après  
l'injection, des échantillons de plasma ont été prélevés, pour effectuer une mesure de  
l'activité d'interféron- $\gamma$ .

L'activité biologique de l'interféron- $\gamma$  est mesurée de la façon suivante. Une  
30 couche confluyente de cellules Wish (Hayflick, L., Exp. Cell Res. 23, 14-20 (1961)) est

mise en présence d'une gamme de concentration d'interféron- $\gamma$  standard (généralement de 100 à 0 U/mL, avec des dilutions de 2 en 2), ou de l'échantillon à doser. Après 24 heures d'incubation dans une étuve à CO<sub>2</sub> à 37°C, les cellules sont infectées avec 100  $\mu$ l de VSV (virus de la stomatite vésiculeuse), dont la concentration est ajustée de façon à produire une lyse total des cellules en 24 heures, en l'absence d'interféron- $\gamma$ . Dans ce test, la dose d'interféron- $\gamma$  qui protège 50 % des cellules de la lyse par le VSV correspond à 1 U/mL. La mesure de la proportion de cellules protégées peut être faite selon la méthode décrite par Mosmann, T., J. Immunol. Meth. 65, 55-63 (1983).

Après l'injection d'interféron- $\gamma$  seul, on a trouvé 42 %, 3,7 % et 1,9 % de l'activité injectée aux temps 2, 60 et 120 minutes, respectivement, alors que 7,4 % et 5,7 % de la quantité injectée sont encore présentes dans le plasma, respectivement, aux temps 60 et 120 minutes. En l'absence d'agent potentialisateur, l'interféron- $\gamma$  est donc partiellement inactivé.

En présence d'héparine utilisée comme agent potentialisateur, on a mesuré, 2 minutes après l'injection, une activité correspondant à 600 % de celle qui avait été injectée. Il y a donc eu une augmentation très rapide de l'activité spécifique de l'interféron- $\gamma$  en présence de l'agent potentialisateur. Au bout de deux heures après l'injection, l'interféron- $\gamma$  est encore deux fois plus actif qu'avant l'injection. Si l'on combine l'augmentation de l'activité et l'augmentation de la quantité circulant d'interféron- $\gamma$ , il y a environ 50 fois plus d'activité d'interféron dans le sang circulant deux heures après l'injection, grâce à l'agent potentialisateur. L'injection d'héparine seule ne fait apparaître aucune activité de type interféron dans le plasma des animaux.

Des résultats analogues, en ce qui concerne les temps de demi-vie et l'augmentation de l'activité, peuvent être observés en remplaçant l'héparine soit par des fragments d'héparine ayant une masse moléculaire de 10 kDa, soit par le fragment IPD décrit l'Exemple I ci-dessus, soit encore par le dextran sulfate ou le fucoïdan.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation comme ingrédient actif dans la préparation d'un médicament modulateur de l'activité de l'interféron- $\gamma$ , d'un agent modulateur comprenant un  
5 groupement de formule A-X-B, dans laquelle A et B représentent indépendamment un groupe oligosaccharidique portant une charge anionique suffisante pour conférer audit groupe oligosaccharidique une affinité pour une partie de l'extrémité C-terminale de l'interféron- $\gamma$  humain contenant la séquence peptidique 125-131, et X est un bras  
10 espaceur de longueur suffisante pour permettre aux groupes A et B de se lier chacun à l'une desdites séquences peptidiques des extrémités C-terminales d'un homodimère d'interféron- $\gamma$ .

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée par le fait que ledit groupe oligosaccharidique porte des groupements sulfate et/ou phosphate.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée par le fait que ledit  
15 groupe oligosaccharidique contient des motifs dérivés d'une osamine N-sulfatée.

4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée par le fait que ledit groupe oligosaccharidique contient en alternance des motifs dérivés de ladite osamine et des motifs dérivés d'un acide uronique éventuellement sulfaté.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée  
20 par le fait que lesdits groupes oligosaccharidiques sont des fragments de dépolymérisation pouvant être obtenus par l'action de l'héparitinase sur l'héparane-sulfate.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée  
25 par le fait que ledit bras espaceur est un polymère contenant des groupements anioniques.

7. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée par le fait que lesdits groupements anioniques sont choisis parmi les groupements sulfate, phosphate et carboxyliques.

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée  
30 par le fait que ledit bras espaceur est dérivé d'un polyoside, d'un polyglycol, d'un poly(acide glycolique) ou d'un poly(acide lactique).

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que ledit bras espaceur est dérivé d'un polyside choisi parmi le polydextran, la cellulose, l'amidon, le carraghénane, le fucoïdan et un glycosaminoglycane, et leurs dérivés.

5        10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que ledit bras espaceur est un fragment de dépolymérisation pouvant être obtenu par l'action de l'héparinase sur l'héparane-sulfate.

10       11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisée par le fait que ledit composé est un polymère biocompatible contenant des groupements anioniques en quantité suffisante au moins sur deux sites correspondant à A et B tels que définis dans la revendication 1.

12. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée par le fait que ledit composé est un dextran sulfate ou le fucoïdan.

15       13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que ledit médicament est exempt d'interféron- $\gamma$ .

14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée par le fait que ledit médicament contient de l'interféron- $\gamma$ .

15. Médicament à base d'interféron- $\gamma$ , caractérisé par le fait qu'il contient un agent modulateur tel que défini dans l'une quelconque des revendications précédentes.

20       16. Médicament selon la revendication précédente, caractérisée par le fait qu'il contient environ une mole d'agent modulateur pour deux moles d'interféron- $\gamma$ .